

食异源物鞘氨醇菌类 UrcA 家族膜蛋白的表达及功能表征

王明月, 郑晓丹, 姚晖, 许玫英*, 陈杏娟*

广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东广州

王明月, 郑晓丹, 姚晖, 许玫英, 陈杏娟. 食异源物鞘氨醇菌类 UrcA 家族膜蛋白的表达及功能表征[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1192-1210.

WANG Mingyue, ZHENG Xiaodan, YAO Hui, XU Meiyong, CHEN Xingjuan. Expression and functional characterization of UrcA-like family membrane protein from *Sphingobium xenophagum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1192-1210.

摘要: 【目的】解析食异源物鞘氨醇菌(*Sphingobium xenophagum*) C1 的类 UrcA 家族膜蛋白 Chr1_2170 的表达策略、DNA 结合特性, 及其在重金属响应与转录调控中的功能。【方法】采用密码子优化、双信号肽引导以及同源分子伴侣共表达策略, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)中对 Chr1_2170 膜蛋白进行表达与纯化; 构建蛋白结合基因组 DNA 片段的功能性启动子文库, 筛选 Chr1_2170 的互作元件; 利用 Chr1_2170-Luc 报告系统分析 Chr1_2170 的重金属响应特性。【结果】成功实现 Chr1_2170 膜蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的异源表达与纯化; 筛选并鉴定出 6 个 Chr1_2170 特异性结合的启动子区域, 其保守基序为 5'-AATXGCGXGTA-3'; 结合基因功能注释发现 Chr1_2170 蛋白调控 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、双组分系统 ATP 结合蛋白、DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 B、丝氨酸水解酶等多个基因的表达。Chr1_2170 对 Cu^{2+} (1-80 $\mu\text{mol/L}$)、 Zn^{2+} (1-80 $\mu\text{mol/L}$)、 Ba^{2+} (1-150 $\mu\text{mol/L}$)表现出剂量依赖性响应。【结论】Chr1_2170 不仅可作为重金属感应元件, 还可作为多功能转录调控因子, 通过识别特定 DNA 序列调控相关基因的表达在细菌环境适应性与应激响应中发挥重要作用。

关键词: 鞘氨醇菌属; UrcA 家族蛋白; 膜蛋白表达; 转录调控; 重金属响应

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910300); 国家自然科学基金(32171409); 广东省重点领域研发计划(2023B0202040001); “广东特支计划”杰出人才项目(2023JC07L096); 广东省科学院发展专项资金(2022GDASZH-2022010101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910300), the National Natural Science Foundation of China (32171409), the Key Research and Development Program of Guangdong Province (2023B0202040001), the Guangdong Special Support Plan Outstanding Talents Project (2023JC07L096), and the GDAS Project of Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010101).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xingjuan, chenxj@gdim.cn; XU Meiyong, xumy@gdim.cn

Received: 2025-10-10; Accepted: 2025-11-10; Published online: 2025-12-04

Expression and functional characterization of UrcA-like family membrane protein from *Sphingobium xenophagum*

WANG Mingyue, ZHENG Xiaodan, YAO Hui, XU Meiyong*, CHEN Xingjuan*

State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To analyze the expression strategy, DNA-binding characteristics, and the role in heavy metal responses and transcriptional regulation of the UrcA-like membrane protein Chr1_2170 from *Sphingobium xenophagum* C1. [Methods] Chr1_2170 was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) by codon optimization, dual-signal peptide guidance, and co-expression with homologous molecular chaperones. The interacting genes of Chr1_2170 were screened by constructing a functional promoter library of protein-bound genomic DNA fragments. The heavy metal response characteristics of Chr1_2170 were analyzed via the Chr1_2170-Luc reporter system. [Results] Chr1_2170 was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). Six promoter regions specifically bound by Chr1_2170 were screened out and identified, with the conserved motif of 5'-AATXGCGXGTA-3'. Gene function annotation predicted that Chr1_2170 regulated multiple genes, including those encoding β -N-acetylglucosaminidase, two-component system ATP-binding protein, DNA topoisomerase IV subunit B, and serine hydrolase. Chr1_2170 showed dose-dependent responses to Cu^{2+} (1–80 $\mu\text{mol/L}$), Zn^{2+} (1–80 $\mu\text{mol/L}$), and Ba^{2+} (1–150 $\mu\text{mol/L}$). [Conclusion] Chr1_2170 functions not only as a heavy metal sensing element but also as a multifunctional transcriptional regulator. It regulates the expression of related genes by recognizing specific DNA sequences, playing a key role in environmental adaptation and stress responses of bacteria.

Keywords: *Sphingobium*; UrcA family protein; membrane protein expression; transcriptional regulation; heavy metal response

鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 最初由 Yabuuchi 等^[1]于 1990 年首次报道。后经 Takeuchi 等^[2]基于 16S rRNA 基因序列的系统发育关系、化学分类特征及生理学特性差异重新划分为 4 个独立的属, 包括狭义鞘氨醇单胞菌属、鞘氨醇菌属 (*Sphingobium*)、新鞘氨醇菌属 (*Novosphingobium*) 以及鞘氨醇盒菌属 (*Sphingopyxis*)。广义鞘氨醇单胞菌以其出色的降解能力著称, 能够代谢多种有机污染物, 如 2-甲基萘^[3]、正丙苯^[4]等多环芳烃, 丙硫菌唑^[5]、

氯氰菊酯^[6]等农药, 以及甲基红、直接黄 12、酸性黑 210 等染料^[7]。此外, 广义鞘氨醇单胞菌还具有优异的重金属耐受特性, 能够在含有高浓度重金属的环境中生存, 甚至可以利用某些重金属作为生长所需的微量元素或进行生物转化^[8]。这些特性使得 *Sphingomonas* 在环境污染治理和环境适应性研究中具有重要的应用价值。例如, 少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 能够在高达 200 mg/L 镉离子 (Cd^{2+}) 培养基中存活, 在 pH 6.0 的条件下对 Cd^{2+} 的去

除率最高可达 84%^[9]。鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.) BSAR-1 可通过其碱性磷酸酶 PhoK 去除碱性溶液中的铀(U), 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中克隆并过表达 PhoK 后的重组菌株能够从含有 0.50–5.00 mmol/L 碳酸铀酰(UO₂CO₃)的碱性溶液中高效地沉淀出 U^[10]。瓜类鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas melonis*) E8 在 pH 6.0、35 °C 的条件下培养 48 h 后, 对污染介质中的镍离子(Ni²⁺)、铜离子(Cu²⁺)和 Cd²⁺ 的去除率分别达到 78%、62% 和 56%^[11]。从重金属与有机物复合污染沉积物中分离的食异源物鞘氨醇菌(*Sphingobium xenophagum*) C1 能够耐受高达 0.25 mmol/L 的汞离子(Hg²⁺)、2 mmol/L 的 Cd²⁺、3 mmol/L 的铅离子(Pb²⁺)、6 mmol/L 的锌离子(Zn²⁺)等重金属离子^[12], 这与其基因组上含有多达 34 个重金属抗性基因元件有关^[13]。

微生物主要以重金属抗性操纵子形式, 通过形成蛋白-金属复合物来调节重金属离子的摄入、胞内迁移/储存以及外排等过程; 这些蛋白元件主要包括金属调控蛋白、金属转运蛋白、金属氧化酶/还原酶、金属螯合蛋白及金属外排蛋白等, 其中多数为膜蛋白^[14]。膜蛋白可作为重金属的螯合蛋白, 参与重金属的解毒与跨膜运输过程, 进而调控重金属在胞内、胞外及细胞器之间的分布和转运^[15]。此外, 膜蛋白还可作为重金属的感应元件, 通过识别并结合重金属离子, 触发细胞内信号转导通路, 从而调控微生物对重金属的响应和适应^[16]。高丽参鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas panacis*) DCY99^T 的 Cd²⁺、Zn²⁺和钴离子(Co²⁺)抗性由 Czc 外排系统介导, 该系统包含 CzcABCD 等组分, 它们共同构成一个膜蛋白转运复合体, 负责将重金属离子从细胞质转运到胞外^[17]。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)的调控蛋白 CadC 通过其 N 端跨膜区锚定于细胞膜, 当感应到 Cd²⁺、Pb²⁺、铋(Bi³⁺)以后, CadC 的胞质 DNA 结合域即刻解除对 *cadCA* 操纵子的抑制, 从而激活外

排泵 CadA 的表达^[18]。新月柄杆菌(*Caulobacter vibrioides*) NA1000 的 U 抗性则与细胞膜上的转录调控蛋白 UrcA 相关^[19]。该蛋白作为一类膜结合感应元件, 参与 U 的识别与转录响应。

C. vibrioides NA1000 的 *urcA* 基因启动子区域内含有 2 个与 U 响应相关的 *m*₅ 特异序列 (tcaaacattacagactgttagaatat 和 cgcgctcatgactgaggtgtaacgaga), 分别位于转录起始位点上游-107 bp 和-55 bp 处^[20]。Park 等^[21]基于转座子随机诱变与 PurcA-lacZ 报告筛选策略, 鉴定了受铀酰离子(UO₂²⁺)强烈诱导表达的启动子 PurcA 的调控元件, 揭示了一种新的由 UzcR 和 UzcS 2 个蛋白构成的 U 响应且兼具 Zn²⁺和 Cu²⁺交叉激活特性的双组分调控系统 UzcRS。其中, UzcR 作为一种全局转录调控因子, 以磷酸化形式直接结合非典型半回文 DNA 位点 *m*₅, 主要激活膜蛋白编码基因的转录, 包括金属肽酶、多重耐药外排泵、TonB 依赖性受体以及大量功能未知的膜蛋白; UzcR 并非简单地“抵抗金属”, 而是启动一条“金属诱导的细胞外膜应激/修复网络”。尽管上述 UzcRS 系统及其调控的 *urcA* 基因在 U 响应中的重要性已被揭示, 但目前仍缺乏 UrcA 自身对靶基因直接调控的实验证据, 对于 UrcA 本身是否直接参与转录调控还知之甚少, 其具体作用机制(如 DNA 结合模式及 U-蛋白相互作用等)尚待阐明。

本课题组前期在 *S. xenophagum* C1 的有机物暴露过程中发现了类 UrcA 家族转录调节蛋白编码基因 *chr1_2170* (NCBI 登录号为 ASY44883.1) 的显著上调表达^[22]。*S. xenophagum* C1 的 Chr1_2170 膜蛋白与 *C. vibrioides* NA1000 的 UrcA 膜蛋白具有 39.47% 一致性。然而, 其是否参与有机物或者重金属的响应调控以及通过何种潜在机制参与调控目前尚不清楚。为了解析 Chr1_2170 膜蛋白的分子功能及其应用潜力, 首先, 通过综合运用密码子优化、信号肽引导及分子伴侣蛋白协同等策略, 克服膜蛋白异源表达的

难题, 为该家族及其他难表达膜蛋白的功能研究提供可行方案; 其次, 通过构建蛋白结合基因组 DNA 片段的功能性启动子文库, 鉴定 Chr1_2170 蛋白的互作基因与调控元件, 为阐明 UrcA 家族蛋白的作用机制提供直接实验证据; 同时, 利用 Chr1_2170-Luc 报告系统研究类 UrcA 家族转录调节蛋白 Chr1_2170 对多种重金属离子的响应功能, 以期拓宽对 UrcA 家族膜蛋白功能多样性的认知, 也为深入理解微生物在复合污染环境中的重金属耐受与适应性调控机制提供新的视角。

表1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and bacterial strains used in this study

Plasmids and strains	Source
Plasmids	
pET22b	Stored in this laboratory
pET24a	Stored in this laboratory
pET30b	Stored in this laboratory
pG-KJE8	TaKaRa Bio Biotechnology (Beijing) Co., Ltd.
pG-Tf2	TaKaRa Bio Biotechnology (Beijing) Co., Ltd.
pET22b-chr1_2170-opt	Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.
pET22b-ES	This study
pET22b-E	This study
pET24a-chr1_2170-luc	This study
pET30b-chr1_1588-nh	This study
Strains	
<i>S. xenophagum</i> C1	Stored in this laboratory
<i>S. xenophagum</i> C1(pET24a-chr1_2170-luc)	Stored in this laboratory
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Nanjing Vazyme Co., Ltd.
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-chr1_2170)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-chr1_2170-opt)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-ES)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-E)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-chr1_2170-opt, pET30b-chr1_1588-nh)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-chr1_2170-opt, pG-KJE8)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-chr1_2170-opt, pG-Tf2)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-ES, pG-KJE8)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-ES, pG-Tf2)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-E, pG-KJE8)	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3, pET22b-E, pG-Tf2)	This study

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

本研究使用的质粒和菌株见表 1。

1.1.2 引物

本研究使用的引物如表 2 所示。引物序列由 Primer Premier 5 软件设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 主要试剂及仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试

表2 用于PCR扩增、重组质粒构建与验证的引物

Table 2 Primers for PCR, recombinant plasmid construction and verification

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Restriction endonuclease cleavage sites
2170-U	AGGAGATATAC <u>ATATGTTCCGTT</u> CGACCCTTTTC	<i>Nde</i> I
2170-D	AG <u>TGGTGGTGGTGGTGGT</u> GCTCGAGGTTCTGCATGCCCTTCGCGCC	<i>Xho</i> I
ES-U	AGCCGGCGATGGCCATGTTTCGTAGCACCCCTGTTC	<i>Nco</i> I
S-D1	GGTTCTGCATACCTTTAGC	
S-D2	AGTGGTGGTGGTGGTGGT <u>GCTCGAGGTT</u> CTGC	<i>Xho</i> I
S-U1	ATGGCCATGGGTGAATTCATCTCTAACGG	<i>Nco</i> I
S-U2	CCAGCCGGCGATGGCCATGGGTGAATTCA	<i>Nco</i> I
chr1_1588-nh-U	CTTTAAGAAGGAGATATAC <u>ATATGATTTGGAGCGCGCGTC</u>	<i>Nde</i> I
chr1_1588-nh-D1	GAGTTAGCCGATGCTCGCTTTGCCCG	
chr1_1588-nh-D2	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGT <u>GCTCGAGTTAG</u>	<i>Xho</i> I
T7	ACATCCACTTTGCCTTTCTC	
T7-TER	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	

U indicates the forward primer and D indicates the reverse primer. Italics indicate restriction endonuclease cleavage sites. The underlined part indicates the 6×His tag.

剂盒、胶回收/DNA 纯化试剂盒、2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)、Green *Taq* Mix 以及 DNA marker, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 常规限制酶 *Nde* I、*Nco* I、*Xho* I, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 基础版同源重组无缝克隆试剂盒, 北京全式金生物科技股份有限公司; Nano-Glo[®] HiBiT 胞外检测试剂, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 琼脂糖、50×TAE 电泳缓冲液、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、考马斯亮蓝 R-250、RealBand 三色预染蛋白 marker (标准范围, 10–180 kDa)、Presto-Gel 15% Tris-Glycine 电泳预制胶(10 孔)、100×细菌用蛋白酶抑制剂复合物、氨苄青霉素(Amp)和卡那霉素(Km), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 胰蛋白胍(tryptone)、酵母提取物(yeast extract), Oxoid 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

微量 UV-Vis 分光光度计、PCR 热循环仪、台式离心机, ThermoFisher Scientific 公司; 小型垂直电泳槽、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;

多功能酶标仪, BioTek 公司。

1.1.4 培养基

LB 培养基 (g/L): Tryptone 10.0, Yeast Extract 5.0, NaCl 5.0; 无机盐培养基参考 Chen 等^[22]的方法配制。

1.2 表达质粒 pET22b-*chr1_2170* 的构建与转化

以 *S. xenophagum* C1 基因组 DNA 为模板, 利用引物 2170-U、2170-D (表 2) 扩增 *chr1_2170* 基因。PCR 反应体系(50 μL): 模板 DNA 400 ng, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μL, ddH₂O 补足。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 57 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min; 4 °C 保存。

以 pET22b 质粒为模板, 使用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切。反应体系(50 μL): 质粒 DNA 约 1 μg, *Nde* I 与 *Xho* I 各 1 μL, 10×QuickCut Buffer 5 μL, ddH₂O 补足。反应条件: 37 °C 孵育 30 min, 80 °C 处理 15 min 使酶失活, 于 4 °C 保存。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后, 切取目标条带并

回收线性化载体。将经 PCR 扩增并纯化后的 *chr1_2170* 基因与上述线性化 pET22b 载体, 按照基础版同源重组无缝克隆试剂盒说明书操作进行无缝连接。连接产物以热激法转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 复苏液涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后挑取单克隆。以 T7/T7-TER 通用引物进行菌落 PCR 验证, 对阳性克隆经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。获得重组质粒 pET22b-*chr1_2170* 及对应的重组菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170*)。

1.3 质粒 pET22b-*chr1_2170* 的密码子优化

对 pET22b-*chr1_2170* 序列进行密码子优化, 以 *Nde* I 和 *Xho* I 为限制性酶切位点, 纯化标签采用 6 \times His 标签, 基因序列的密码子优化由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 获得 pET22b-*chr1_2170-opt* 重组质粒。通过热激法转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 获得重组菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*)。

1.4 不同信号肽质粒及菌株的构建

以 pET22b-*chr1_2170-opt* 为模板, 采用两轮重叠 PCR 构建含不同信号肽的基因片段。首轮以 ES-U/S-D1 为引物扩增得产物 ES1; 再以 ES1 为模板, ES-U/S-D2 扩增并回收, 获得同时携带 *E. coli* PelB 信号肽及 *Chr1_2170* 自身信号肽的片段 ES。同样地, 以 pET22b-*chr1_2170-opt* 为模板, 先后使用 S-U1/S-D1 及 S-U2/S-D2 扩增, 获得仅含 PelB 信号肽的片段 E。用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切线性化 pET22b 载体, 分别与片段 ES 或 E 进行无缝连接。产物经热激法转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 复苏液涂布含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 获得重组菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES) 和 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-E)。

1.5 不同分子伴侣菌株的构建

将购买的分子伴侣蛋白表达质粒 pG-KJE8 和 pG-Tf2 分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 获得重组菌株 *E. coli* BL21(DE3, pG-KJE8) 和 *E. coli* BL21(DE3, pG-Tf2)。采用 CaCl_2 法分别制备相应感受态细胞, 并将密码子优化后的 pET22b-*chr1_2170-opt* 质粒分别转化到制备的感受态细胞中, 获得分子伴侣蛋白共表达重组菌株: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pG-KJE8) 和 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pG-Tf2)。

为获得不含信号肽的分子伴侣蛋白 *Chr1_1588* 片段, 以 *S. xenophagum* C1 基因组 DNA 为模板, 采用两轮重叠 PCR: 首轮引物为 *chr1_1588-nh-U/chr1_1588-nh-D1*, 次轮引物为 *chr1_1588-nh-U/chr1_1588-nh-D2*, PCR 产物命名为 *chr1_1588-nh*。随后, 用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切线性化 pET30b 载体, 并与 *chr1_1588-nh* 片段连接, 构建表达质粒 pET30b-*chr1_1588-nh*。该质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 获得重组菌 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-*chr1_1588-nh*)。进一步将 pET22b-*chr1_2170-opt* 转化至上述感受态细胞, 获得分子伴侣蛋白共表达重组菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pET30b-*chr1_1588-nh*)。

1.6 膜蛋白 *Chr1_2170* 的表达及纯化

挑取验证正确的重组菌株单克隆接种于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜。次日按 1% 接种量转接至新鲜 LB, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 达 0.4–0.8, 加入终浓度 0.10–1.50 mmol/L IPTG 进行诱导, 并在 20、30、37 $^{\circ}\text{C}$ 下继续培养 3–24 h, 研究密码子优化、分子伴侣共表达及信号肽替换对膜蛋白 *Chr1_2170* 表达量的影响, 并以携带空载体 pET22b 的 *E. coli* BL21(DE3, pET22b) 为对照。诱导结束后, 各取 1 mL 菌液, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 \times g 离心 1 min 收集菌体, 重悬于 8 mol/L 尿素, 加入终

浓度 100 mmol/L DTT 及蛋白上样缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 2% SDS, 0.10% 溴酚蓝, 10% 甘油), 100 °C 金属浴 10 min, 25 °C、10 000 r/min 离心 1 min, 取 10 μ L 上清进行 SDS-PAGE 检测目的蛋白表达效果。凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h, 之后进行持续脱色, 多次更换脱色液直到蛋白条带清晰。

扩大培养并收集诱导后的菌液, 于 4 °C、6 500 \times g 离心 15 min, 菌体用裂解缓冲液 (300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 7.5) 重悬, 加入 100 \times 细菌用蛋白酶抑制剂复合物后, 高压破碎细胞 (30 MPa, 4 °C 重复破碎 2 次)。4 °C、10 000 \times g 离心 15 min, 上清即蛋白原液, 4 °C 保存备用。取部分蛋白原液进行 SDS-PAGE, 剩余样品过 Ni-NTA 柱纯化, 4 °C 孵育 30 min, 收集部分流出液。依次使用含 50、100、125、150、175 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱。分别收集洗脱液后续进行蛋白 SDS-PAGE。

1.7 膜蛋白 Chr1_2170 互作基因的筛选与分析

基于蛋白结合基因组 DNA 片段的功能性启动子文库高通量筛选策略鉴定与 Chr1_2170 蛋白互作的基因。参考 Li 等^[23]方法, 构建 *S. xenophagum* C1 基因组 DNA 随机文库。将细胞破碎液中的 Chr1_2170 蛋白固定于 Ni-NTA 亲和柱, 分别用 0、25、50、75 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱杂蛋白后, 加入基因组 DNA, 使 Chr1_2170 蛋白与基因组 DNA 在结合缓冲液 (40 mmol/L HEPES, 20 mmol/L 硫酸铵, 20 mmol/L KCl, 0.40% Tween-20, 2 mmol/L DTT) 中孵育 30 min。先用漂洗液 (100 mmol/L Tris-HCl, 2.50 mmol/L EDTA \cdot 2Na, 0.10% Tween-20) 洗脱无结合蛋白的基因组 DNA, 再用 100 mmol/L 咪唑洗脱蛋白-DNA 复合物。然后加入终浓度 0.50% 的 SDS 使 Chr1_2170 蛋白变性, 释放与之结合的 DNA 片段。对洗脱下来的基因组 DNA 进行纯化回收、

连接克隆载体并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行一次筛选, 随后提取所有阳性克隆的质粒 DNA 电转至 *S. xenophagum* C1 感受态细胞进行二次筛选。最后提取所有阳性克隆的基因组 DNA, 使用测序引物扩增目的片段后, 送至广东美格基因科技有限公司进行高通量测序。

测序获得的序列经 NCBI Nucleotide BLAST 比对, 确定其在 *S. xenophagum* C1 基因组中的位置及相关信息。候选启动子区域由在线工具 BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom>) 预测, 保守元件分析采用 MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)。

1.8 膜蛋白 Chr1_2170 的金属响应功能分析

课题组前期利用 Chr1_2170 蛋白作为识别元件, 结合荧光素酶小标签作为报告元件, 成功构建了 pET24a-chr1_2170-luc 质粒, 并以 *S. xenophagum* C1 为底盘构建了生物传感细胞^[22]。接种 *S. xenophagum* C1 (pET24a-chr1_2170-luc) 到含有 50 μ g/mL Km 的 LB 中, 30 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 约为 1.0。经 25 °C、10 000 \times g 离心 1 min 收集菌体。以 50% 的 LB 洗涤菌体 2 次后, 按 2% 接种量转接至 5 mL 新鲜 50% 的 LB 培养基中。分别加入不同终浓度的重金属母液 (100 μ mol/L), 继续培养至 OD_{600} 为 0.4。

使用无机盐培养基洗涤并重悬菌体, 取 50 μ L 菌液添加 50 μ L 的 Nano-Glo[®] HiBiT 胞外检测试剂, 立即于多功能酶标仪上进行荧光素酶活性分析, 以不添加重金属离子进行培养的菌液为阴性对照组, 每组设置 3 个平行。另取 300 μ L 菌液测定 OD_{600} 值以校正单位荧光值。

2 结果与分析

2.1 蛋白系统发育分析

为了阐明 *S. xenophagum* C1 来源的类 UrcA 转录调节蛋白 Chr1_2170 (WP_017182018.1) 的进化起源及其与其他细菌同源蛋白的亲缘关系,

通过邻接法构建了基于 UrcA 家族转录调节蛋白的系统发育树(图 1)。整体而言, 系统发育树的拓扑结构呈现出多个高支持率(bootstrap 值 ≥ 0.75)的主要分支, 这些分支分别对应了 *Sphingobium*、链霉菌属(*Streptomyces*)、冷杆菌

属(*Cryobacterium*)等。值得注意的是, 这些分支所代表的细菌属在分类学上亲缘关系较远, 分属于不同的门: *Sphingobium* 属于假单胞菌门, 而 *Streptomyces* 和 *Cryobacterium* 则同属于放线菌门。这一分布模式表明, UrcA 家族蛋白可能

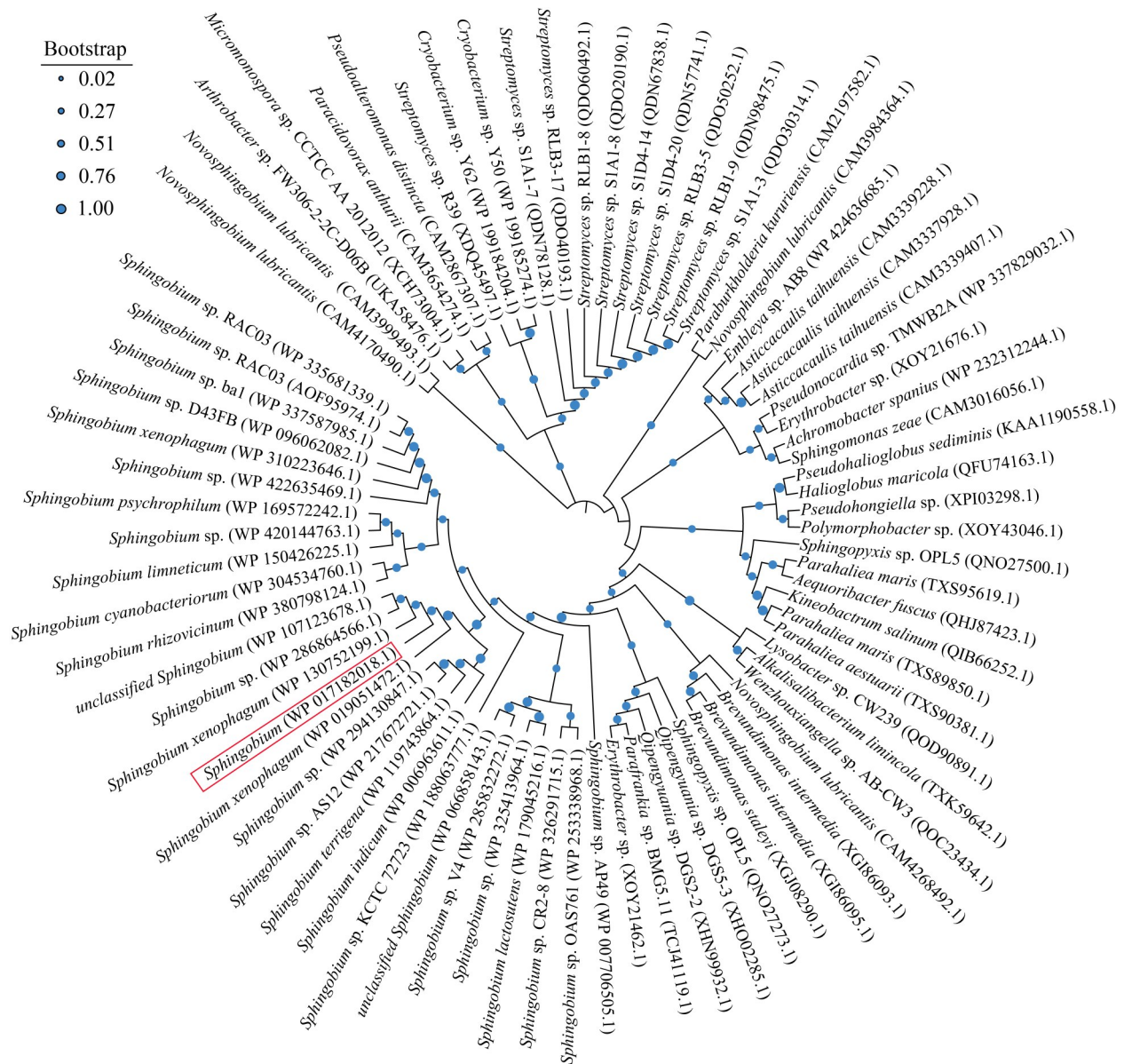


图1 基于邻接法的UrcA家族转录调控蛋白系统发育分析。Bootstrap值代表系统发育树分支可靠性/置信度, 红色方框代表本研究中的Chr1_2170膜蛋白。

Figure 1 Phylogenetic analysis of the UrcA family transcriptional regulatory proteins based on adjacency method. Bootstrap values represent phylogenetic tree branch reliability/confidence, and red box represents Chr1_2170 membrane protein in this study.

起源于一个古老的共同祖先，并在不同的细菌大类中得以保留；也不排除其通过水平基因转移在不同类群间传播的可能性。本研究中的 Chr1_2170 蛋白位于 *Sphingobium* 分支内，提示其与该属内的同源蛋白具有最近共同进化起源。

2.2 膜蛋白 Chr1_2170 的表达与纯化

2.2.1 密码子优化及与信号肽引导对 Chr1_2170 膜蛋白表达的影响

SDS-PAGE 分析表明，简单克隆 *S. xenophagum* C1 基因组中的 *chr1_2170* 基因并连接表达载体 pET22b 无法在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功表达 Chr1_2170 膜蛋白。序列分析显示 *chr1_2170* 基因含有多处在 *E. coli* 中低频率使用的密码子，且存在连续稀有密码子，推测可能因此影响了 Chr1_2170 膜蛋白的翻译效率。为了提高 *E. coli* BL21(DE3) 对 *chr1_2170* 编码氨基酸所使用的密码子偏好性，减少稀有密码子造成的翻译效率下降、暂停甚至终止，对 *chr1_2170* 基因序列进行了密码子优化。然而 SDS-PAGE 结果显示仍未能实现 Chr1_2170 膜蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达(图 2)。

PeIB 信号肽是 *E. coli* 中一种分泌信号肽，能够高效地引导外源蛋白穿越细胞膜进入周质空间或分泌到细胞外^[23]。在同时保留 PeIB 信号肽与 Chr1_2170 自身信号肽的情况下，于 37 °C、 $OD_{600}=0.8$ 、1 mmol/L IPTG 诱导 3 h 的条件下，成功检测到预期分子量的 Chr1_2170 膜蛋白条带(图 2)。然而，当敲除 Chr1_2170 自身信号肽后，即使引入 PeIB 信号肽，在多种诱导条件下均不能检测到 Chr1_2170 膜蛋白表达，表明自身信号肽对 Chr1_2170 膜蛋白的表达具有至关重要的作用。

2.2.2 分子伴侣协同作用对 Chr1_2170 膜蛋白表达的影响

除了密码子使用偏好性以及信号肽引导分泌对膜蛋白异源表达具有重要影响外，分子伴

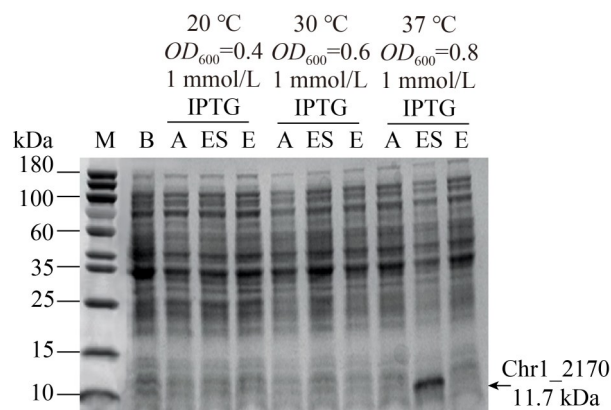


图2 密码子优化后信号肽引导分泌的菌株的全细胞蛋白表达SDS-PAGE

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the total proteins of *Escherichia* strains after codon optimization and signal peptide-guided secretion. Lane M: Protein molecular weight markers (10–180 kDa); Lane B: *E. coli* BL21(DE3, pET22b); Lane A: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170*-opt); Lane ES: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES); Lane E: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-E).

侣蛋白的协同作用在膜蛋白正确折叠及表达过程中也发挥重要作用。本研究构建了3种不同分子伴侣系统共表达的重组菌株：分别携带质粒 pG-KJE8 (编码 *E. coli* 的 DnaK-DnaJ-GrpE 和 GroEL-GroES)、pG-Tf2 (编码 *E. coli* 的 trigger factor 和 GroEL-GroES) 和 pET30b-*chr1_1588*-nh (编码 *S. xenophagum* C1 中一种含 PDZ 结构域分子伴侣蛋白^[6])。共表达 pG-KJE8 或 pG-Tf2 的菌株中相应的分子伴侣蛋白的特征条带大小分别为 pG-KJE8: 约 70、57、40、20、10 kDa; pG-Tf2: 约 60、57、10 kDa。然而，研究结果显示均未检测到预期大小的 Chr1_2170 膜蛋白条带(约 11.7 kDa)，表明这 2 种 *E. coli* 来源的分子伴侣系统在本研究条件下未能有效促进 Chr1_2170 膜蛋白的表达。相较于空载体对照组及共表达 pG-KJE8 或 pG-Tf2 实验组，仅在共表达 pET30b-*chr1_1588*-nh 的重组菌 *E. coli* BL21

(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pET30b-*chr1_1588-nh*)中检测到 *Chr1_2170* 膜蛋白目的条带(图 3)。值得注意的是, *Chr1_2170* 与 *Chr1_1588-nh* 编码的伴侣蛋白(约 13 kDa)在 SDS-PAGE 胶上的迁移位置相近, 导致其条带分离度有限。上述结果表明, *S. xenophagum* C1 来源的 *Chr1_1588-nh* 编码蛋白对 *Chr1_2170* 在 *E. coli* 中的表达具有促进作用, 而 *E. coli* 分子伴侣系统(pG-KJE8 和 pG-Tf2)却未能有效提升 *Chr1_2170* 的表达水平。

2.2.3 IPTG 浓度对 *Chr1_2170* 膜蛋白表达的影响

以经过信号肽引导和分子伴侣共表达优化的 2 种重组菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES) 和 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*,

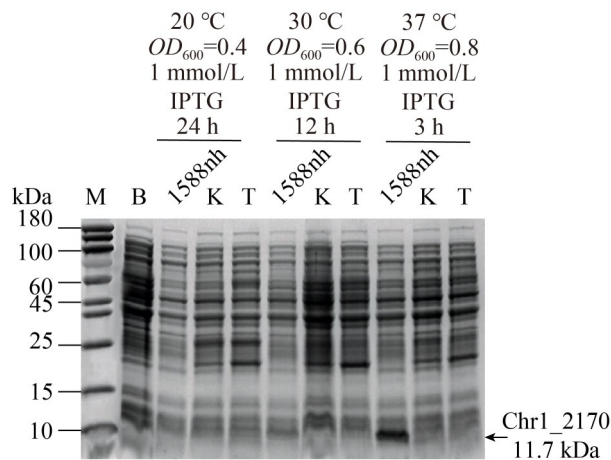


图3 分子伴侣共表达的菌株的全细胞蛋白表达 SDS-PAGE

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the total proteins of *Escherichia coli* strains after co-expression by molecular chaperones. Lane M: Protein molecular weight marker (10–180 kDa); Lane B: *E. coli* BL21 (DE3, pET22b); Lane 1588nh: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pET30b-*chr1_1588-nh*); Lane K: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pG-KJE8); Lane T: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pG-Tf2).

pET30b-*chr1_1588-nh*)为研究对象, 保持其他条件不变, 通过改变 IPTG 浓度(0.10、0.50、1.00、1.50 mmol/L)来探究 *Chr1_2170* 膜蛋白诱导表达的最适浓度。结果发现, 在不同浓度的 IPTG 诱导条件下, *Chr1_2170* 膜蛋白的表达水平并无明显差异(图 4)。考虑到 IPTG 的价格及其对细胞的毒性作用, 后续纯化实验均采用 0.10 mmol/L 的 IPTG 进行蛋白诱导表达。此外, 菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES)表达的膜蛋白分子量比 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pET30b-*chr1_1588-nh*)表达的膜蛋白的分子量大(图 4)。这很可能是由于信号肽优化引入的 PelB 信号肽序列未被成功切除, 导致 *E. coli* BL21 (DE3, pET22b-ES)表达的是 N 端融合了 PelB 序列的 PelB-*Chr1_2170*-His 融合蛋白。

2.2.4 膜蛋白 *Chr1_2170* 的 Ni-NTA 柱纯化

采用最适诱导表达条件 ($OD_{600}=0.8$, 0.10 mmol/L IPTG, 37 °C, 3 h)对 *Chr1_2170* 膜

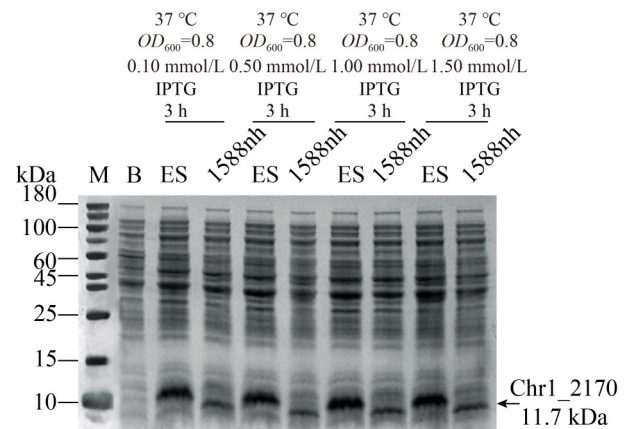


图4 不同浓度IPTG诱导的菌株的全细胞蛋白表达 SDS-PAGE

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the total protein of *Escherichia coli* strains induced by different concentrations of IPTG. Lane M: Protein molecular weight marker, 10–180 kDa; Lane B: *E. coli* BL21 (DE3, pET22b); Lane ES: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES); Lane 1588nh: *E. coli* BL21(DE3, pET22b-*chr1_2170-opt*, pET30b-*chr1_1588-nh*).

蛋白进行诱导表达, 并进行 Ni-NTA 柱纯化。结果发现使用 100 mmol/L 的咪唑缓冲液即可将 Chr1_2170-His 膜蛋白从 Ni-NTA 柱上洗脱下来。SDS-PAGE 结果显示(图 5), 在菌株 *E. coli* BL21 (DE3, pET22b-chr1_2170-opt, pET30b-chr1_1588-nh) 中表达及纯化出来的 Chr1_2170 膜蛋白的分子量大小与预测的分子量一致。在菌株 *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES) 中表达的 Chr1_2170 膜蛋白的分子量高于预测值, 但同时存在一条较弱、分子量大小与预测一致的蛋白条带。这反映了目标蛋白在细胞内存在不同的加工状态。较大的条带很可能是未被有效切除 PelB 信号肽的、未成熟的全长融合蛋白(PelB-Chr1_2170-His), 而较小的条带则对应于信号肽被成功切除后的成熟 Chr1_2170-His 蛋白。在周质分泌表达过程中, 信号肽的切除可能不完全, 导致前体与成熟体蛋白在细胞裂解液中共存。经过 Ni-NTA 柱纯化只能获得分子量与预测蛋白大小一致的目标条带, 而分子量较大的 PelB-Chr1_2170-His 条带在洗脱组分中几乎不可见。这很可能是由于 N 端 PelB 信号肽序列未被有效切除而改变了 Chr1_2170 膜蛋白构象或产生了空间位阻效应, 导致 His 标签无法充分暴露, 从而阻碍了 PelB-Chr1_2170-His 与 Ni-NTA 柱的有效结合, 因此未能被有效纯化出来。尽管经过 Ni-NTA 柱结合、洗涤与洗脱等多步操作后, 膜蛋白的最终回收量有所损失, 导致纯化蛋白电泳条带较弱, 但所获得的蛋白样品在后续实验中表现出了良好的活性, 足以满足本研究的需求。

2.3 Chr1_2170 膜蛋白互作元件筛选与功能分析

利用蛋白结合基因组 DNA 片段的功能性启动子文库高通量筛选方法, 鉴定出与 Chr1_2170 膜蛋白互作的 DNA 序列。经与 NCBI 数据库及 *S. xenophagum* C1 基因组注释信息进行比较, 共筛选到包含这些 DNA 序列的 6 个基因簇(表 3)。

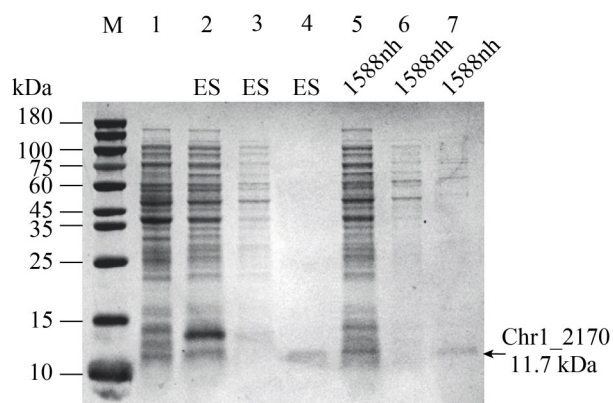


图5 Chr1_2170蛋白的纯化

Figure 5 Purification of Chr1_2170 protein. Lane M: Protein molecular weight markers (10–180 kDa); Lane 1: Cell disruption solution with blank control; Lanes 2 and 5: Cell disruption fluid after induction of expression; Lanes 3 and 6: 50 mmol/L imidazole eluent; Lanes 4 and 7: 100 mmol/L imidazole eluent; ES: Recombinant strain *E. coli* BL21(DE3, pET22b-ES); 1588nh: Recombinant strain *E. coli* BL21(DE3, pET22b-chr1_2170-opt, pET30b-chr1_1588-nh).

为了验证这些互作片段的功能相关性, 使用 BIPROM 在线工具对表 3 中各基因的潜在启动子区域进行了预测分析(图 6)。结果发现通过克隆文库筛选获得的 DNA 序列与在线预测的基因启动子区域高度重叠, 且预测所得启动子均为正向。Chr1_2170 蛋白很可能作为转录调控因子通过结合这些启动子区域从而调控其下游正向基因的转录。这 6 个受 Chr1_2170 调控的靶基因分别为: (1) β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Chr1_2073), 催化从多种 β -D-聚糖和 β -D-糖苷中水解去除非还原性糖基末端残基, 参与细菌基础代谢过程; (2) 双组分系统 ATP 结合蛋白(Chr1_2116), RocR 类转录调控因子/组氨酸激酶, 通过信号自磷酸化实现转录调控从而快速启动逆境应答; (3) DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 B (Chr1_2809) 和丝氨酸水解酶(β -内酰胺酶相关) (Chr1_2810), Chr1_2809 是拓扑异构酶 IV 的一部分, 控制 DNA 的拓扑状态, 参与超螺旋结构模板的

表3 Chr1_2170蛋白互作基因及其下游调控序列

Table 3 Chr1_2170 protein interaction genes and their downstream regulatory sequences

Gene cluster	Gene name	Genes encode protein	Function	Orientation	-10	-35	Motify
1	<i>chr1_536</i>	Hypothetical protein	Unknown	+	AGGTAAATT	TTGTCG	AATTGTGCGTA
	<i>chr1_537</i>	Hypothetical protein	Unknown	+			
2	<i>chr1_1914</i>	Terminase large subunit	Phage terminase-like protein	+	CTCTACAAT	TCGCGA	ATTTGCGTGAA
	<i>chr1_1915</i>	Hypothetical protein	Unknown	-			
	<i>chr1_1916</i>	Hypothetical protein	Unknown	+			
	<i>chr1_1917</i>	Hypothetical protein	Unknown	+			
3	<i>chr1_2019</i>	Phage major capsid protein	Predicted phage phi-C31 gp36 major capsid-like protein	-	AGATAGCCT	CTGCTA	ATTTGCGTGTA
	<i>chr1_2020</i>	HK97 family phage prohead protease	Caudovirus prohead serine protease	-			
	<i>chr1_2021</i>	Phage/plasmid primase, P4 family	DNA primer enzymes associated with bacteriophages or plasmids	-			
	<i>chr1_2022</i>	Hypothetical protein	Unknown	-			
	<i>chr1_2023</i>	Magnesium and cobalt transport protein CorA	Maintain intracellular magnesium concentration at physiologically essential levels	-			
	<i>chr1_2024</i>	Hypothetical protein	Unknown	+			
4	<i>chr1_2072</i>	Rieske 2Fe-2S domain-containing protein	Chlorophyllide a oxygenase/letal leaf spot protein	+	TGGTATGTT	TTGCCG	AATGGCTGGTA
	<i>chr1_2073</i>	Beta-N-acetylhexosaminidase (EC: 3.2.1.52)	Hydrolysis of glycosidic bonds, breakdown of peptidoglycan, chitin (chitin) and host mucin, release of monosaccharides	+			
5	<i>chr1_2115</i>	hrpB; ATP-dependent helicase HrpB	It uses the energy of ATP hydrolysis to remodel RNA secondary structure, regulate gene expression, and play a role in transcription, DNA repair, or stress response	-	GACTATATT	GGGCCG	AATTGCGGGTA
	<i>chr1_2116</i>	ATP-binding protein	RocR-type transcriptional regulator	+			
6	<i>chr1_2808</i>	Outer membrane protein	Opacity protein LomR and related surface antigens	-	CGCTATAAT	TCGGCG	AATGGCGCGAA
	<i>chr1_2809</i>	DNA topoisomerase IV subunit B	DNA topoisomerase IV subunit B	+			
	<i>chr1_2810</i>	Serine hydrolase	Beta-lactamase class A	+			

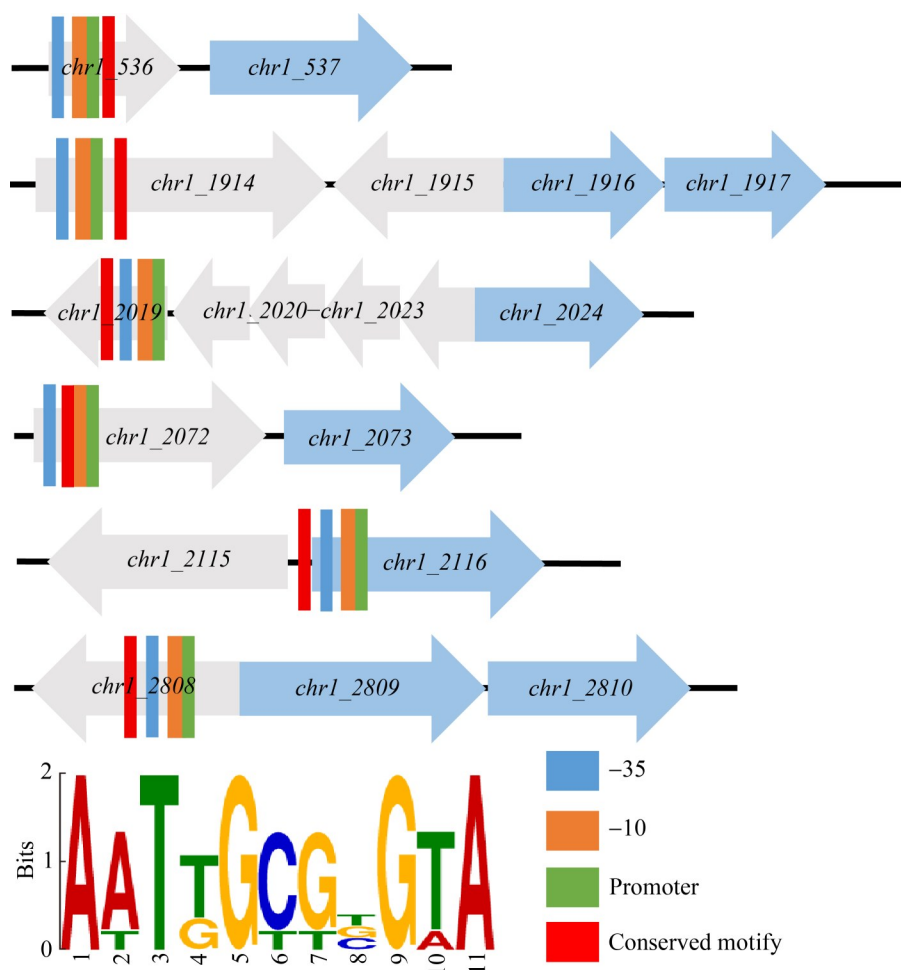


图6 Chr1_2170蛋白结合的基因组启动子片段及其保守基序

Figure 6 Genomic promoter fragments bound by Chr1_2170 protein.

调节，保障 DNA 复制与分离；Chr1_2810 可水解 β -内酰胺类抗生素(例如青霉素、头孢菌素)的 β -内酰胺环，从而使其失活，赋予细菌在对抗生素环境压力胁迫时的生存优势。其余 3 个基因编码假设蛋白(Chr1_537、Chr1_1916、Chr1_2024)，具体功能未知。为了进一步解析 Chr1_2170 膜蛋白的 DNA 结合特异性，对上述启动子区域进行了保守基序(motif)分析。结果发现最显著的 motif 为 5'-AATXGCGXGTA-3' (E -value= 4.8×10^3)。该序列模式在 Chr1_2170 蛋白结合的 DNA 片段中呈现一定的保守性，Chr1_2170 蛋白很可能通过特异性识别启动子中的该特定序列来调控下游靶基因的表达。这一调控模型目

前主要基于功能性启动子文库筛选结果以及生物信息学预测分析结果而提出，后续仍需要通过以下实验进行确证：首先，利用凝胶阻滞实验(EMSA)在体外验证 Chr1_2170 蛋白与该 motif 的结合能力；其次，通过报告基因实验在体内比较 Chr1_2170 存在与缺失条件下该 motif 启动子驱动报告基因表达的差异，从而在活体细胞中确认其转录调控活性及方式。这些实验将为本研究提出的调控模型提供更直接的证据。

2.4 Chr1_2170 膜蛋白的金属响应功能研究

将携带 pET24a-*chr1_2170*-*luc* 报告载体的 *S. xenophagum* C1 传感细胞暴露于终浓度为

1 $\mu\text{mol/L}$ 的不同金属离子溶液中, 随后加入 Nano-Glo[®] HiBiT 胞外检测试剂测定荧光素酶活性。与未添加金属离子的对照组相比, Chr1_2170 膜蛋白对各种低浓度的金属离子均无响应信号。当金属离子浓度增加到 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, Chr1_2170 膜蛋白对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、钡(Ba^{2+})、锰(Mn^{2+})、钙(Ca^{2+})、钛(Ti^{2+})、 Hg^{2+} 、银(Ag^{+})表现出一定的响应信号。进一步提高金属离子浓度至 50 $\mu\text{mol/L}$ 后, Chr1_2170 膜蛋白仅对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 具有明显的信号响应。高浓度的 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、锑(Sb^{3+})对 *S. xenophagum* C1 底盘细胞表现出强烈的毒性效应, 导致细胞无法正常生长。为了解析 Chr1_2170 膜蛋白对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 的传感能力, 在 1–200 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内进一步测定了其剂量响应关系。结果显示, Chr1_2170 蛋白对 3 种金属离子的荧光响应呈现浓度依赖性增强趋势, 且在特定浓度范围内呈线性关系: Cu^{2+} (1–80 $\mu\text{mol/L}$)、 Zn^{2+} (1–80 $\mu\text{mol/L}$)、 Ba^{2+} (1–150 $\mu\text{mol/L}$)。当 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 浓度分别达到 150、80、150 $\mu\text{mol/L}$ 时响应信号达到峰值, 随后均呈现下降趋势(图 7)。

3 讨论与结论

膜蛋白在异源宿主中表达时常因错误折叠、聚集及膜定位效率低等问题导致其功能丧失, 这使得研究膜蛋白的结构与功能变得困难^[24-25]。为了克服这些障碍, 研究者常采用密码子优化、信号肽引导和分子伴侣协同表达等策略来强化膜蛋白在异源宿主中的表达; 首先, 密码子优化策略通过适配宿主的密码子使用偏好, 避免了因稀有密码子对应的 tRNA 丰度不足而引起的翻译延伸受阻、核糖体停滞、氨基酸错误掺入或新生肽链提前终止等问题, 从而提高重组蛋白的产量和功能完整性^[26]。然而, 在本研究中仅对 *chr1_2170* 基因的密码子进行优化, 并不能使 Chr1_2170 膜蛋白成功表达。这说明单独依赖密码子优化策略在某些情况下并不足以实现

膜蛋白的高效异源表达, 而需要结合其他策略。重组蛋白表达受多种因素共同影响, 某些蛋白即使在密码子优化后仍难以达到预期的表达水平^[27]。其次, 信号肽在引导蛋白质定向转运、促进正确折叠及决定其最终定位中发挥关键作用, 缺乏合适的信号肽引导可能导致膜蛋白在细胞膜中降解, 进而无法积累至可检测水平^[28]。将 PelB 信号肽融合至目的蛋白 N 端, 依靠不同的分泌途径引导蛋白分泌到周质空间, 促进目的蛋白分泌表达的方法, 这种信号肽工程策略在 *E. coli* 中已成功应用^[29-31]。在本研究中引入 *E. coli* 的 PelB 信号肽可以使完整的 Chr1_2170 成功表达, 但当仅使用 PelB 信号肽替代 Chr1_2170 自身信号肽时, 无论在何种诱导条件下均未检测到 Chr1_2170 膜蛋白表达。这表明 Chr1_2170 自身的信号肽对其整体结构稳定性、折叠途径或膜整合过程具有重要作用; 自身信号肽的缺失会导致蛋白无法正确折叠、组装或稳定存在, 甚至会破坏蛋白参与特定的翻译后修饰过程, 从而导致蛋白无法正常表达^[32]。此外, 外源蛋白在 *E. coli* 中表达时常因错误折叠而形成包涵体或被蛋白酶降解^[33]。分子伴侣能够协助细胞内新生肽正确折叠、表达, 帮助蛋白质跨膜定位等^[34-36]。本研究引入了 *S. xenophagum* C1 中含 PDZ 结构域的分子伴侣蛋白 Chr1_1588^[37], 通过协助 Chr1_2170 正确折叠和稳定从而实现了其在 *E. coli* 中的异源表达。然而, 引入 *E. coli* 的分子伴侣系统(pG-KJE8 和 pG-Tf2)却未能有效实现 Chr1_2170 的表达, 这可能是由于宿主来源不同导致分子伴侣的适配性问题, 即不同宿主来源的分子伴侣蛋白对蛋白的正确折叠与表达具有不同的作用, 这也进一步说明了跨宿主表达系统的复杂性^[38]。最终, 通过整合密码子优化、PelB 与自身信号肽融合的信号肽工程以及分子伴侣协同表达策略, 本研究成功实现了 *S. xenophagum* C1 的膜蛋白 Chr1_2170 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达, 并获得了纯化的蛋白。这为复杂膜蛋白的异源表达提供

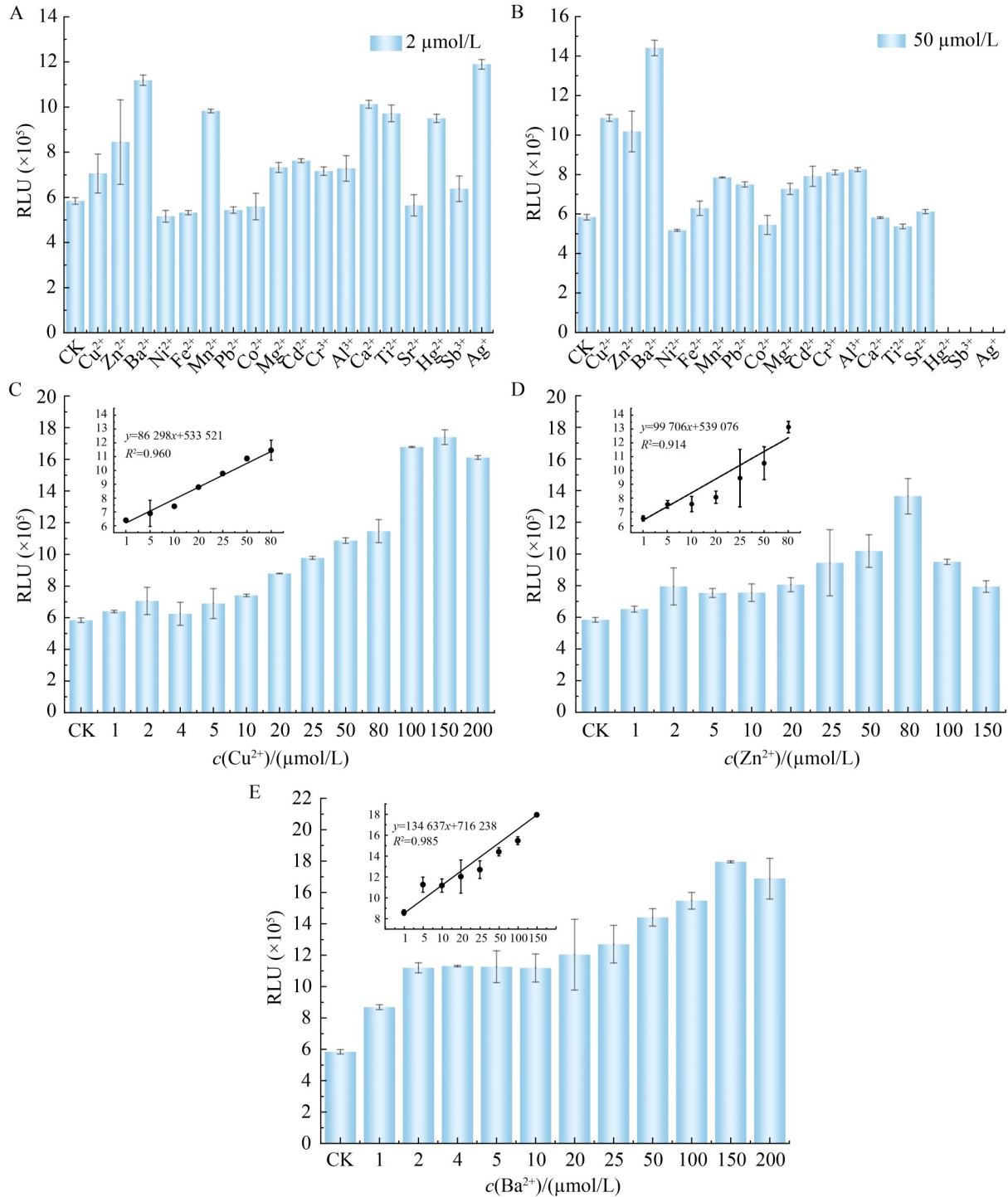


图7 Chr1_2170膜蛋白对金属离子的响应功能。A、B: 金属选择性响应; C、D、E: Cu²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺的动态检测(1–200 $\mu\text{mol/L}$)。

Figure 7 Response to metal by Chr1_2170. A, B: Selective response to metals; C, D, E: Dynamic detection of Cu²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ (1–200 $\mu\text{mol/L}$).

了新的策略和思路, 尤其是在膜蛋白表达中使用信号肽与分子伴侣协同作用策略, 也为后续的蛋白功能研究和应用奠定了基础。

在此基础上, 进一步研究了膜蛋白 Chr1_2170 的 DNA 结合特性与调控功能。利用纯化的 Chr1_2170 膜蛋白, 通过蛋白结合基因组 DNA 片段的功能性启动子文库高通量筛选方法结合生物信息学分析, 本研究鉴定了 Chr1_2170 蛋白结合的 6 个关键启动子区域, 这些启动子区域具有保守基序 5'-AATXGCGXGTA-3' (E -value=4.8 $\times 10^3$)。这一结果表明, Chr1_2170 蛋白很可能通过识别启动子中的该特定序列来调控下游靶基因的表达。这些靶基因的功能具有多样性, 如代谢功能相关(β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 Chr1_2073)、信号转导与调控(双组分系统蛋白 Chr1_2116)、DNA 复制与分离(DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 B Chr1_2809)以及多个功能未知的蛋白(Chr1_537、Chr1_1916、Chr1_2024)。提示 Chr1_2170 并非一个针对单一通路或应激反应的简单调控因子, 而更可能是一个多功能转录调控因子, 参与细菌在复杂环境中的多种生理活动调控过程。首先, Chr1_2170 靶向参与 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Chr1_2073)水解 β -D-聚糖和 β -D-糖苷, 可能在肽聚糖水解和细胞壁重塑中发挥重要作用, 以增强细菌在营养限制环境中的适应力^[39]。此外, Chr1_2170 还调控一个双组分系统 ATP 结合蛋白(Chr1_2116)。Chr1_2116 的 N 端具有 RocR 类转录调控因子保守结构, 而 C 端具有组氨酸激酶保守结构, 通过信号的自磷酸化实现转录调控从而快速启动逆境应答; Chr1_2170 通过调控 Chr1_2116 的转录形成复杂的调控网络, 从而调整细胞对环境信号的敏感性与响应强度^[40]。丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的 FimS/AlgR 系统, 其中转录因子 AlgR 在富营养条件下激活碳代谢基因, 在贫瘠条件下转而激活群体感应系统, 同一双组分系统在转录因子的调控下进行弹性调节基因表达, 体现了细菌的环境适应性和调节

灵活性^[41]。此外, Chr1_2170 还调控 DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 B 的转录(Chr1_2809), GyrB 亚基与 GyrA 亚基一起形成 DNA 拓扑异构酶, 能够引入负超螺旋, 对 DNA 的复制与分离具有重要的作用; Chr1_2170 可能通过调控 Chr1_2809 的表达水平从而直接影响基因组的稳定性和转录效率, 帮助细菌在重金属或其他胁迫条件下维持基因组的完整性^[42]。Chr1_2170 调控的丝氨酸水解酶(Chr1_2810)可水解 β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环, 赋予细菌在面对抗生素胁迫时的生存优势^[43]。

Chr1_2170 不仅参与转录调控, 其本身作为一个膜蛋白还具有重金属感应功能。重金属响应实验表明, Chr1_2170 对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ba^{2+} 具有剂量依赖性响应, 而对其他测试金属离子响应微弱或无响应, 这种差异性主要取决于金属离子独特的物理化学性质与蛋白结合活性位点微环境之间的特异性匹配; 蛋白的重金属结合位点由特定的氨基酸残基构成, 其空间构型和配体场强度可能更适于容纳 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的配位几何, 而与其他离子(如 Mn^{2+} 、 Ca^{2+})匹配度较差导致结合亲和力低^[44]。对于 Hg^{2+} 和 Ag^+ , 其在传感浓度下表现出的强烈细胞毒性, 是其无法产生有效信号的决定性因素, 这也提示 Chr1_2170 可能直接或间接地感知这些金属离子, 进而调控下游基因的表达以应对金属胁迫, 这为进一步理解细菌如何适应复杂环境中的重金属污染提供了新的视角。Chr1_2170 调控的多个靶基因与重金属胁迫响应相关。例如, Chr1_2170 对 DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 B (Chr1_2809) 的调控可能构成了一种应对金属胁迫的间接 DNA 保护策略; 高浓度重金属离子会诱导 DNA 损伤, 而 DNA 损伤修复过程会引入显著的拓扑压力; Chr1_2170 介导 DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 B 上调可能有效应对 DNA 的拓扑结构改变或协助修复系统进行损伤修复, 从而维持基因组的完整性^[45]。

此外, Chr1_2170 调控的双组分系统(Chr1_

2116)可能进一步放大金属感应信号,调控下游基因的表达;这种信号放大机制与 *C. vibrioides* NA1000 中的 UzcRS 双组分系统类似,该系统能够感知金属离子(UO_2^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+}),并通过磷酸化级联反应显著放大信号,进而调控下游应激响应基因(如外排泵、膜蛋白等)的表达^[21]。细菌使用双组分系统来感知特定的重金属,然后调节这些金属阳离子的稳态;在 *E. coli* 中双组分系统 HydHG (又称 ZraSR)在好氧条件下通过组氨酸激酶 HydH 感知高浓度 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 并将 HydG 磷酸化,从而上调负责 Zn^{2+} 外排的 *zraP* 基因的表达^[46]。Chr1_2170 作为双组分系统调控通路的上游调控因子或协同因子,增强细菌对金属胁迫信号的敏感性及其响应效率,表明了 Chr1_2170 在环境应激中的多功能角色。

本研究通过整合密码子优化、双信号肽引导(PelB 与自身信号肽融合)以及同源分子伴侣 Chr1_1588 共表达策略,成功实现了 *S. xenophagum* C1 膜蛋白 Chr1_2170 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达与纯化。利用纯化的膜蛋白构建了功能性启动子文库并进行了 Chr1_2170 互作元件的筛选,鉴定出 Chr1_2170 特异性结合的基因启动子保守基序 5'-AATXGCGXGTA-3' ($E\text{-value}=4.8\times 10^3$),结合基因功能注释与保守结构域分析发现 Chr1_2170 蛋白参与调控细胞基础代谢、信号转导与应激响应、基因组稳定性维持等过程,表明它是一个多功能转录调控因子。这不仅拓展了对 UrcA 家族膜蛋白功能的认知,也为细菌如何在复杂环境中适应重金属胁迫提供了参考。此外,Chr1_2170-Luc 报告系统对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ba^{2+} 具有剂量依赖性响应,表明 Chr1_2170 蛋白具有重金属感应功能。进一步验证了 Chr1_2170 作为 UrcA 家族成员既是重金属感应元件,也是多功能转录调控因子。本研究不仅为深入理解 UrcA 家族蛋白的功能和调控机制提供了新的视角,也为重金属响应研究及微生物环境适应性研究提供了重要参考。

尽管本研究成功建立了 Chr1_2170 膜蛋白

的异源表达体系,并初步揭示了其作为重金属感应元件及多功能转录调控因子的角色,但工作中仍存在一些局限性。例如,膜蛋白表达与纯化的挑战使得最终获得的蛋白产量有限,这在一定程度上制约了需要大量高纯度蛋白的研究。其次,Chr1_2170 膜蛋白与金属离子的直接相互作用及其特异性识别机制还有待阐明。此外,通过体外筛选鉴定的 Chr1_2170 调控靶点及其推测的生物学功能后续仍需在体内进行直接实验验证。未来的研究将重点围绕以下三方面展开:(1)优化 Chr1_2170 膜蛋白的纯化方案,以期获得更高产量的高纯度蛋白,为后续研究提供充足材料;(2)通过凝胶阻滞实验验证 Chr1_2170 及其突变体对金属离子的结合,解析其关键的金属结合位点;(3)通过报告基因实验在体内比较 Chr1_2170 存在与缺失条件下保守基序启动子驱动基因表达的差异,并比较 2 种条件下菌株的重金属胁迫生长状况及靶基因转录水平变化,确证 Chr1_2170 在应激响应网络中的核心调控功能。这些工作将为全面阐明 Chr1_2170 膜蛋白转录调控的分子机制奠定更坚实的基础。

作者贡献声明

王明月:实验数据收集和处理,论文的撰写;郑晓丹:参与蛋白互作基因筛选实验;姚晖:参与荧光素酶响应实验;许玫英:提供专业见解和意见;陈杏娟:研究构思和设计,对论文进行修改和补充。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] YABUUCHI E, YANO I, OYAIZU H, HASHIMOTO Y, EZAKI T, YAMAMOTO H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*[J]. *Microbiology and Immunology*, 1990,

- 34(2): 99-119.
- [2] TAKEUCHI M, HAMANA K, HIRAISHI A. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 4): 1405-1417.
- [3] LI JB, CAI XX, DENG YR, ZHANG DY, LI B, LUO CL, ZHANG G. Single-cell analysis of microbial degradation mechanisms and remediation potential for emerging pollutants: a case study on methyl-naphthalene[J]. Environmental Science & Technology, 2025, 59(9): 4709-4720.
- [4] SAKAI M, MORI JF, KANALY RA. Utilization of the C9 aromatic hydrocarbon *n*-propylbenzene by *Sphingobium barthaii* KK22 and coexistence of multiple biodegradation pathways[J]. Biodegradation, 2025, 36(4): 54.
- [5] HUANG JW, LI MZ, JIN FS, WANG ZQ, LI WP, PAN DD, LI QX, WU XW. Isolation of *Sphingomonas* sp. AJ-1 and its enantioselective S-methylation of the triazole fungicide prothioconazole[J]. Science of The Total Environment, 2022, 851(Pt 2): 158220.
- [6] 魏淑珍, 郭继平, 吴荣荣, 梁魁景, 张志强, 王茜, 王婷婷, 张彩凤, 李志涛, 李辉, 朱冰清. 降解氯氟菊酯的鞘氨醇单胞菌及其应用, CN104531589B[P/OL]. <https://d.wanfangdata.com.cn/patent/CN201510016653.3>. WEI SZ, GUO JP, WU RR, LIANG KJ, ZHANG ZQ, WANG Q, WANG TT, ZHANG CF, LI ZT, LI H, ZHU BQ. *Sphingomonas* for degrading cypermethrin and its application, CN104531589B[P/OL]. <https://d.wanfangdata.com.cn/patent/CN201510016653.3>.
- [7] KHAN A, NAYARISSERI A, SINGH SK. Characterization and optimization of azo dyes degrading microbes isolated from textile effluent[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 11241.
- [8] LI DB, LI XJ, TAO Y, YAN ZN, AO YS. Deciphering the bacterial microbiome in response to long-term mercury contaminated soil[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 229: 113062.
- [9] TANGAROMSUK J, POKETHITIYOOK P, KRUAETRACHUE M, UPATHAM ES. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass[J]. Bioresource Technology, 2002, 85(1): 103-105.
- [10] NILGIRIWALA KS, ALAHARI A, RAO AS, APTE SK. Cloning and overexpression of alkaline phosphatase PhoK from *Sphingomonas* sp. strain BSAR-1 for bioprecipitation of uranium from alkaline solutions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5516-5523.
- [11] HEIDARI P, SANAEIZADE S, MAZLOOMI F. Removal of nickel, copper, lead and cadmium by new strains of *Sphingomonas melonis* e8 and *Enterobacter hormaechei* WW28[J]. Journal of Applied Biotechnology Reports, 2020, 7(4): 208-214.
- [12] CHEN XJ, WANG HJ, XU JJ, SONG D, SUN GP, XU MY. *Sphingobium hydrophobicum* sp. nov., a hydrophobic bacterium isolated from electronic-waste-contaminated sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(10): 3912-3916.
- [13] SONG D, CHEN XJ, XU MY, HAI R, ZHOU AF, TIAN RM, van NOSTRAND JD, KEMPER ML, GUO J, SUN GP, ZHOU JZ. Adaptive evolution of *Sphingobium hydrophobicum* C1^T in electronic waste contaminated river sediment[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2263.
- [14] OLEŃSKA E, MAŁEK W, SWIECICKA I, WÓJCIK M, THIJS S, VANGRONSVELD J. Bacteria under metal stress-molecular mechanisms of metal tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(12): 5716.
- [15] ZBIERALSKI K, STASZEWSKI J, KONCZAK J, LAZAREWICZ N, NOWICKA-KAZMIERCZAK M, WAWRZYCKA D, MACIASZCZYK-DZIUBINSKA E. Multilevel regulation of membrane proteins in response to metal and metalloid stress: a lesson from yeast[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(8): 4450.
- [16] HE GD, TIAN WJ, QIN LJ, MENG LL, WU DX, HUANG Y, LI DD, ZHAO DG, HE TB. Identification of novel heavy metal detoxification proteins in *Solanum tuberosum*: insights to improve food security protection from metal ion stress[J]. Science of the Total Environment, 2021, 779: 146197.
- [17] KIM YJ, PARK JY, BALUSAMY SR, HUO Y, NONG LK, THI LE H, YANG DC, KIM D. Comprehensive genome analysis on the novel species *Sphingomonas panacis* DCY99T reveals insights into iron tolerance of ginseng[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 2019.
- [18] XU C, ZHOU TQ, KURODA M, ROSEN BP. Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes[J]. The Journal of Biochemistry, 1998, 123(1): 16-23.
- [19] HU P, BRODIE EL, SUZUKI Y, MCADAMS HH, ANDERSEN GL. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(24): 8437-8449.
- [20] HILLSON NJ, HU P, ANDERSEN GL, SHAPIRO L. *Caulobacter crescentus* as a whole-cell uranium biosensor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7615-7621.
- [21] PARK DM, OVERTON KW, LIOU MJ, JIAO YQ. Identification of a U/Zn/Cu responsive global regulatory two-component system in *Caulobacter crescentus*[J]. Molecular Microbiology, 2017, 104(1): 46-64.
- [22] CHEN XJ, YAO H, SONG D, SUN GP, XU MY. Extracellular chemoreceptor of deca-brominated diphenyl ether and its engineering in the hydrophobic chassis cell for organics biosensing[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 433: 133266.
- [23] LI XQ, JIANG X, XU MY, FANG Y, WANG Y, SUN GP, GUO J. Identification of stress-responsive transcription factors with protein-bound *Escherichia coli* genomic DNA libraries[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 199.
- [24] KANG MK, TULLMAN-ERCEK D. Engineering expression and function of membrane proteins[J]. Methods, 2018, 147: 66-72.
- [25] ANGIUS F, ILIOAIA O, AMRANI A, SUISSE A, ROSSET L, LEGRAND A, ABOU-HAMDAN A, UZAN

- M, ZITO F, MIROUX B. A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8572.
- [26] ROOTS CT, HILL AM, WILKE CO, BARRICK JE. Codon usage modulates the relationship between the burden and yield of protein overexpression[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2025, 19(1): 50.
- [27] CHANEY JL, CLARK PL. Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2015, 44: 143-166.
- [28] OWJI H, NEZAFAT N, NEGAHDARIPOUR M, HAJIEBRAHIMI A, GHASEMI Y. A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2018, 97(6): 422-441.
- [29] MENG YH, XIE LH, YOU KH, CHEN W. High-level secretory production of leghemoglobin and myoglobin in *Escherichia coli* through inserting signal peptides[J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103356.
- [30] CHAO SY, LIU YH, DING N, LIN Y, WANG Q, TAN JW, LI W, ZHENG Y, HU XJ, LI JM. Highly expressed soluble recombinant anti-GFP VHHs in *Escherichia coli* via optimized signal peptides, strains, and inducers[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 848829.
- [31] RAHMATABADI SS, ASKARI S, KHADEMI F, SOLEYMANI B. The study of different signal peptides in improvement of recombinant proteins solubility in *E. coli*: a review article[J]. *Current Proteomics*, 2024, 21(3): 129-139.
- [32] KAUSHIK S, HE HZ, DALBEY RE. Bacterial signal peptides- navigating the journey of proteins[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 933153.
- [33] JIANG RZ, YUAN ST, ZHOU YL, WEI YW, LI FL, WANG MM, CHEN B, YU HM. Strategies to overcome the challenges of low or no expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 75: 108417.
- [34] BHATWA A, WANG WJ, HASSAN YI, ABRAHAM N, LI XZ, ZHOU T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 630551.
- [35] HOROVITZ A, REINGEWERTZ TH, CUÉLLAR J, VALPUESTA JM. Chaperonin mechanisms: multiple and (mis)understood?[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2022, 51: 115-133.
- [36] THIRUMALAI D, LORIMER GH, HYEON C. Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones[J]. *Protein Science*, 2020, 29(2): 360-377.
- [37] TAGUCHI H, KOIKE-TAKESHITA A. *In vivo* client proteins of the chaperonin GroEL-GroES provide insight into the role of chaperones in protein evolution[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2023, 10: 1091677.
- [38] ROSANO GL, CECCARELLI EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 172.
- [39] 吴昊, 刘嘉荔, 杨静文, 胡雪芹, 张洪斌. 双酶协同降解胶体几丁质及其作用机制[J]. *食品科学*, 2022, 43(6): 74-80.
- WU H, LIU JL, YANG JW, HU XQ, ZHANG HB. Synergistic enzymatic degradation of colloidal chitin and its mechanism[J]. *Food Science*, 2022, 43(6): 74-80 (in Chinese).
- [40] SIMON V, TROUILLON J, ATTRÉE I, ELSEN S. Functional and pangenomic exploration of Roc two-component regulatory systems identifies novel players across *Pseudomonas* species[J]. *Molecular Microbiology*, 2025, 123(5): 439-453.
- [41] XIE YP, LI JW, DING YQ, SHAO XL, SUN Y, XIE FZ, LIU SY, TANG SJ, DENG X. An atlas of bacterial two-component systems reveals function and plasticity in signal transduction[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(3): 111502.
- [42] DORMAN CJ. DNA supercoiling and transcription in bacteria: a two-way street[J]. *BMC Molecular and Cell Biology*, 2019, 20(1): 26.
- [43] BUSH K, JACOBY GA. Updated functional classification of β -lactamases[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(3): 969-976.
- [44] DUDEV T, LIM C. Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(1): 538-556.
- [45] AHMADI JALALDEHI P, ABBASLOU H, SHAHTAHERI SJ, MALEKSHAHI ZV, FARAHMAND DERAV N, AZAM K, KHADEM M. Occupational exposure to heavy metals and its association with DNA oxidative stress among urban green space workers[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15: 21585.
- [46] 赵静宇, 张健, 祁庆生, 王倩. 基于细菌双组分系统的生物传感器的研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(1): 38-52.
- ZHAO JY, ZHANG J, QI QS, WANG Q. Research progress in biosensors based on bacterial two-component systems[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(1): 38-52 (in Chinese).